

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-023992

(43)Date of publication of application : 30.01.1996

(51)Int.Cl.

C12P 19/26  
C12N 1/20  
//(C12P 19/26  
C12R 1:46 )

(21)Application number : 06-161574

(71)Applicant : NISSEI KAGAKU KOGYO KK  
OSAKA CITY

(22)Date of filing : 13.07.1994

(72)Inventor : HIYAMA KEIICHIRO  
HIGASHIHARA MASATAKA  
KOBAYASHI OSAMU  
HATANAKA YOSHIRO  
SAKO MASAYUKI  
OKABE MASASHICHI  
AKIKAZE YUTAKA  
YADA TOMOAKI

## (54) PRODUCTION OF HYALURONIC ACID

### (57)Abstract:

PURPOSE: To produce a large amount of hyaluronic acid having high molecular weight in high efficiency at a low cost while preventing the intrusion of hemolytic streptolysin S and O by culturing a specific hyaluronic acid-producing bacterial strain and separating the acid from the cultured liquid.

CONSTITUTION: A bacterial strain capable of producing hyaluronic acid, free from productivity of chondroitinase, exhibiting anhemolytic property and belonging to the genus Streptococcus [preferably Streptococcus equi NC930627 (FERM P-14341)] is cultured in a medium and hyaluronic acid produced and accumulated in the cultured liquid is separated from the liquid by conventional method. The culture of Streptococcus equi NC930627 is preferably carried out at 30-35°C and pH 7-7.5 using glucose as the carbon source. The Streptococcus equi NC930627 can be produced e.g. by mutating Streptococcus equi ATCC 9527 and mutating again the produced strain free from chondroitinase productivity.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner s  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-23992

(43)公開日 平成8年(1996)1月30日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/26		7432-4B		
C 1 2 N 1/20	A	8828-4B		
// (C 1 2 P 19/26				
C 1 2 R 1:46)				

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平6-161574

(22)出願日 平成6年(1994)7月13日

(71)出願人 591057522  
日精化学工業株式会社  
大阪府大阪市西淀川区福町1丁目8-7

(71)出願人 591030499  
大阪市  
大阪府大阪市北区中之島1-3-20

(72)発明者 檜山 圭一郎  
奈良市敷島町1-1121-28

(72)発明者 東原 昌孝  
河内長野市荘園町24-27

(72)発明者 小林 修  
大阪市淀川区三国本町1-16-27-916

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒアルロン酸の製造方法

(57)【要約】

【構成】 ヒアルロン酸生産能を有し、コンドロイチナーゼ非生産性でかつ非溶血性を示すストレプトコッカス・エクイ変異株を培地に培養して、培養液中にヒアルロン酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするヒアルロン酸の製造方法。

【効果】 本発明によるストレプトコッカス・エクイ変異株を培養することにより、溶血素を含まずかつ高分子量のヒアルロン酸を優れた収率で得ることができる。

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒアルロン酸生産能を有し、コンドロイチナーゼ非生産性でかつ非溶血性を示すストレプトコッカス属に属する細菌を培地に培養して、培養液中にヒアルロン酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするヒアルロン酸の製造法。

【請求項2】 ストレプトコッカス属に属する細菌がストレプトコッカス・エクイである特許請求の範囲第1項記載のヒアルロン酸の製造方法。

【請求項3】 ストレプトコッカス属に属する細菌がストレプトコッカス・エクイNC930627である特許請求の範囲第1項もしくは第2項記載のヒアルロン酸の製造方法。

【請求項4】 ヒアルロン酸生産能を有し、コンドロイチナーゼ非生産性でかつ非溶血性を示すストレプトコッカス属に属する変異株。

【請求項5】 ストレプトコッカス属に属する変異株が、ストレプトコッカス・エクイNC930627である請求項4記載の変異株。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ヒアルロン酸の製造方法に関する。より詳細には、ヒアルロン酸生産能を有し、コンドロイチナーゼ非生産性でかつ非溶血性を示すストレプトコッカス属に属する細菌を培地に培養して、溶血素を含まずかつ高分子量のヒアルロン酸を効率よく製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒアルロン酸は生体のあらゆる組織に存在するムコ多糖である。ヒアルロン酸は生体中で単独あるいはタンパク質や、他のムコ多糖類と結合して複合体を形成し、生体の水の保持、組織構造の維持、潤滑作用、細菌侵入の防御などの働きをしている。このような機能を利用してヒアルロン酸は医薬品（眼薬、関節炎治療薬、創傷治癒剤等）、化粧品等に使用されている。工業的には、鶏の鶏冠やサイ帯等の生体組織から抽出法によって得られている。近年、細菌を培養して、その培養液からヒアルロン酸を得る方法も見られるようになって

【0003】しかしながら生体組織からの抽出によるヒアルロン酸の製造は、タンパク質、コンドロイチン硫酸等の夾雑物が大量に存在するため、分離精製が大変煩雑で、大量生産に不向きであった。そのため、得られたヒアルロン酸はきわめて高価なものとなり、ヒアルロン酸の機能を十分に利用することができない状態である。

【0004】微生物によるヒアルロン酸の生産については、ストレプトコッカス属細菌のうちで、ランスフィールド(Lansfield)血清群のA、C及びD型菌、例えば、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・ゾオエピデミカス(*Streptococcus zooepidemicus*)、ストレプトコッカス・エクイ(*Streptococcus equi*)、ストレプトコッカス・エクイシミリス(*Streptococcus equisimilis*)、ストレプトコッカス・ディスガラクティエ(*Streptococcus dysgalactiae*)、パスツレラ・マルトシダ(*Pasteurella multocida*)等が知られているが、*S. pyogenes*と、*Pasteurella*はヒトに対する病原菌であるため、ヒアルロン酸の生産には不向きである。工業的にはストレプトコッカス属の細菌を培養して、その培養液からヒアルロン酸を抽出・精製する方法が、特開昭63-141594号等

に開示されている。しかしながら、これらの方法は得られるヒアルロン酸が低分子量であったり、収率が低いなどの問題が存在する。

【0005】一方、細菌のコンドロイチナーゼはヒアルロニダーゼ活性を有するエンドーβ-ヘキソサミニドエリミナーゼであることが知られており[科学と工業 49, 11(1975)]、本発明者らはこの知見に着目し、ヒアルロン酸を生産するストレプトコッカス属に属する菌株をコンドロイチナーゼ非生産性とすることにより、高分子量のヒアルロン酸を生産すると考えた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ヒアルロン酸を生産するストレプトコッカス属に属する菌株のコンドロイチナーゼ非生産性株を得、これによって高分子量のヒアルロン酸を大量に効率良く得ることのできる製造方法を提供することである。

【0007】

【課題を達成するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、ストレプトコッカス・エクイATCC9527株(*Streptococcus equi* ATCC9527)から変異処理によって得たコンドロイチナーゼ非生産株を、再度変異処理することにより、溶血性を欠如し、高分子ヒアルロン酸の生産性が極めて高い菌株、ストレプトコッカス・エクイNC930627(*Streptococcus equi* NC930627)を得、該菌株を培養することにより、高分子量のヒアルロン酸が製造できることを見いだし、本発明を完成した。

【0008】即ち、本発明は、ヒアルロン酸生産能を有し、コンドロイチナーゼ非生産性でかつ非溶血性を示すストレプトコッカス属に属する細菌を培地に培養して、培養液中にヒアルロン酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするヒアルロン酸の製造方法である。

【0009】以下、本発明を詳しく説明する。

【0010】(1)変異株の取得

本発明にいうコンドロイチナーゼ非生産性変異株は、ヒアルロン酸を生産するストレプトコッカス属に属する菌株、例えばストレプトコッカス・エクイATCC9527株を紫外線や化学薬品(N-メチル-N'-ニトロ-N-ニオロソグアニジン(NTG)、メチルメタンホルホン酸等で変異処理し、この処理菌株をGVF寒天培地

(グルコース2%、酵母エキス1%、ポリペプトン1%、リン酸一カリウム0.2%、寒天1.5%、pH 6.3)に植菌・培養後、生育の良い菌株をさらにコンドロイチン硫酸寒天培地(酵母エキス0.2%、ポリペプトン0.2%、炭素源としてコンドロイチン硫酸0.4%、リン酸一カリウム0.1%)に植菌し、生育していない菌株として得ることができる。

【0011】次に、この菌株を再び常法により変異処理し、処理菌体をウマ脱繊維素血液寒天培地に植菌・培養し、非溶血性(ストレプトリシン-s欠落)の変異株を取  
10 得する。本菌株は血液寒天培地に穿刺培養しても溶血環を生じないことより溶血素の一つであるストレプトリシン-oの生産能も欠落していると考えられ、より安全な非溶血性株であると言える。

#### 【0012】(2) 菌学的性質

(1) で得られたストレプトコッカス・エクイの変異株(以下、本菌という)は、ブレイン・ハート・インフュ  
ージョン寒天培地上で極めて強い粘性を有する透明な集  
落を形成し、非溶血性( $\beta$ -溶血性:陰性)、コンドロ  
イチナーゼ非生産性、ランスフィールド血清群C型に属  
20 する連鎖状球菌である。本菌の菌学的性質は下記の通りである。

#### 【0013】

- (a) グラム染色性:陽性
- (b) 10℃増殖性:陰性
- (c) 45℃増殖性:陰性
- (d) 0.1%メチレンブルー抵抗性:陰性
- (e) 6.5%食塩抵抗性:陰性
- (f) 40%胆汁酸抵抗性:陰性
- (g) バシトラシン抵抗性:陰性
- (h) pH9.6抵抗性:陰性
- (i) 60℃、30分抵抗性:陰性
- (j) ゼラチン分解性:陰性
- (k) でんぷん分解性:陽性
- (l) エスクリン分解性:陰性
- (m) 糖発酵性:グルコース(+)、ガラクトース(-)、シュクロース(+)、ラクトース(-)、マルトース(+)、ソルビトール(-)、サリシン(+)、グリセリン(-)、マンニトール(-)、トレハロース(-)
- (n) ビタミン要求性:ビタミンB<sub>1</sub>(+)、リボフラビン(+)、パントテン酸カルシウム(-)、ピリドキシン塩酸塩(+)、ニコチン酸(+)、p-アミノ安息香酸(+)、葉酸(-)、ピオチン(-)、ビタミンB<sub>12</sub>(-)
- (o) アミノ酸要求性:DL-アラニン(-)、L-アルギニン(-)、DL-アスパラギン酸(+)、L-システイン(-)、L-グルタミン酸(-)、グリシン(+)、L-ヒスチジン(+)、DL-イソロイシン(+)

(-)、DL-メチオニン(+)、DL-フェニルアラニン(-)、L-プロリン(+)、DL-セリン(-)、DL-スレオニン(+)、DL-トリプトファン(+)、L-チロシン(-)、DL-バリン(+)

本菌は平成6年5月27日付けで工業技術院微生物工業技術研究所にFERMP-14341として寄託されている。

#### 【0014】(3) 本菌によるヒアルロン酸の製造

本発明に用いる培地は、通常の培養に用いるものでよく、グルコース、フラクトース、ガラクトース、シュクロース等の炭素源、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、亜硫酸ソーダ、チオ硫酸ソーダ、リン酸アンモニウム等の無機塩、ポリペプトン、酵母エキス、カザミノ酸、コーンステープリカー等の有機栄養源の他、各種アミノ酸、ビタミン類等が適宜用いられる。これらの培地成分は一括仕込み、または分割添加のいずれに於いてもよい。

【0015】本発明の培養は、使用する菌は通性嫌気性菌であることより、通気培養または嫌気培養のいずれでもよく、培養温度は25~40℃、好ましくは30~35℃が望ましい。

【0016】培養液のpHは菌の生育と共に低下するため、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア等の塩基によりpH6.5~8.5、好ましくはpH7~7.5にコントロールする。

【0017】本菌は高分子量のヒアルロン酸を極めて高い収率、生産性で生産する菌株であるが、炭素源として特にグルコースを用いると良い結果が得られる。糖の添加量が1%では対糖収率17%であるが、添加量を増す  
30 に従い対糖収率は減少する。糖の添加を6%以上にすると、培養液の粘性は35℃で8000センチポイズ(cp)となり、培養液は流動性がなく、攪拌数を増しても効果はない。培養は、使用している炭素源が培養液中で完全に消費される時点まで行う。

【0018】培養液中に蓄積されたヒアルロン酸の分離、精製は容易で、既に公知の分離法を用いればよい。すなわち、培養終了後、ヒアルロン酸濃度が0.5~1.0g/Lになるように培養液を希釈し、トリクロロ酢酸、塩酸、または硫酸等の酸でpHを酸性に調整する。本操作中に、夾雑する蛋白質と低分子量のヒアルロン酸がムチンクロットと呼ばれる複合体を形成して析出するので、例えば遠心分離、あるいは精密濾過や活性炭あるいはセライトを濾過助材とする濾過等による除菌および除蛋白質が可能となり、以後の精製操作を容易ならしめる。

【0019】除菌・除蛋白後、透析処理による低分子化合物の除去、精密濾過処理による水不溶微粒子の除去を行った後、ヒアルロン酸含有液にアルコール、アセトン、ジオキサンなどの水溶性有機溶媒を添加してヒアルロン酸を抽出する。あるいは塩析法、フーリードライ法等で

直接ヒアルロン酸を得る。

【0020】このようにして上記培養液から抽出精製して得たヒアルロン酸について標品と対比しながら検討した結果、得られたものがヒアルロン酸であることを確認できる。以下にその性質を示す。

【0021】(1) 酢酸セルロース膜を用いる電気泳動において標品と同じ位置にバンドを有する。

(2) 放線菌ヒアルロニダーゼによって分解される。

(3) D-グルクロン酸及びN-アセチル-D-グルコサミンがモル比1:1で存在する。

(4) 薄膜法による赤外吸収スペクトルは標品と同じである。

(5) 極限粘度法による分子量測定 (T.C.Laurent et al., Biochim. Biophys. Acta, 42, 476-485, 1960) の結果、150万である。

【0022】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0023】【実施例1】

(i) 変異株の取得

ストレプトコッカス・エクイATCC9527株をGY P培地中、30℃で10時間培養し、対数増殖期の菌体を遠心分離によって集菌し、5℃で0.05Mリン酸緩衝液(pH6.5)を用いて無菌的に洗浄した後、 $1 \times 10^8$  個/mlの菌濃度になるように同緩衝液に懸濁し、これにNTGを200 $\mu$ g/mlとなるように添加し、30℃にて30分間振とうした。処理後速やかに遠心分離機にて集菌し、0.05Mリン酸緩衝液(pH6.5)で2回洗浄した後、GY P培地に植菌して37℃、2時間培養し、培養液を希釈後、GY P寒天培地に再度植菌した。30℃、72時間培養後、増殖の活発なコロニーから釣菌し、コンドロイチンを炭素源とする寒天培地上に再度植菌・同条件で培養し、生育してこない菌株をコンドロイチナーゼ非生産株として取得した。なお、上記コンドロイチナーゼ生産・非生産菌の識別法は、本発明者らの考案によるものである。

【0024】得られた菌株は $\beta$ -溶血性(溶血素: ストレプトリシン-s)を示していたので、再度上記と同様に変異処理を行った。処理後、ウマ脱繊維素血液寒天培地上に植菌・培養し、溶血性を示されない菌株を取得した(ストレプトコッカス・エクイNC930627, F

ERM P-14341)。

【0025】(ii) 変異株によるヒアルロン酸の製造  
グルコース2%、ポリペプトン1.5%、酵母エキス0.5%、リン酸一カリウム0.2%、硫酸マグネシウム七水塩0.05%、アデカノールLG-109(消泡剤; 旭電化工業製)0.005%の組成の培地(pH7.0)3Lを5L容のジャファーメンターに入れ、滅菌後、前培養したストレプトコッカス・エクイNC930627を1%接種し、6N-水酸化ナトリウム水溶液で培養pH7に常時コントロールしながら30℃で48時間通気(1vvm)攪拌培養した。

【0026】グルコースは別に滅菌しておき、培養開始時に添加するか、培養途中においても、グルコースの残存量を測定しながら適時添加していき、トータルで6%を添加した。培養の経過と共にヒアルロン酸が蓄積し、培養32時間で培養液の粘性は8000センチポイズに達し、攪拌が効かなくなった。培養48時間後、グルコースが完全に消費されたので培養を終了した。

【0027】ブラスアウトした培養液は高粘度のため水で100センチポイズ以下になるように希釈し、トリクロ酢酸でpH4以下に調整した。析出してきたムチンクロット及びその他の夾雑物を菌体と共にマイクロフィルターモジュール(PW-103旭化成製)で除去し、更に限外濾過モジュールに通して低分子物質を除去した。その後エタノールを添加し、沈殿してきた固形物を減圧乾燥して30g(培養液1L当たり6g)のヒアルロン酸を得た。得られたヒアルロン酸は電気泳動において標品と同じ位置にバンドを有し、かつ、赤外線吸収スペクトル、ストレプトミセスのヒアルロニダーゼによる分解、D-グルクロン酸及びN-アセチル-D-グルコサミンが、モル比で1:1で存在すること等でヒアルロン酸であることが確認された。なお、極限粘度法による分子量測定の結果、150万であった。

【発明の効果】本発明によるストレプトコッカス・エクイ変異株を培養することにより、これまで報告されているストレプトコッカス属細菌を用いたヒアルロン酸の製造法における収率、収量を上回り、さらに高分子量で、かつ溶血素として知られているストレプトリシン-sおよびストレプトリシン-oの混入のないヒアルロン酸を安価に得ることができる。このようにして得られたヒアルロン酸は化粧品、医薬品原料として使用できる。

フロントページの続き

(72)発明者 畠中 芳郎

大阪市東淀川区相川2-11-14

(72)発明者 酒匂 正幸

大阪市西淀川区福町1-8-7 日精化学工業株式会社内

(72)発明者 岡部 征七  
大阪市西淀川区福町1-8-7 日精化学  
工業株式会社内

(72)発明者 秋風 裕  
大阪市西淀川区福町1-8-7 日精化学  
工業株式会社内

(72)発明者 矢田 智昭  
大阪市西淀川区福町1-8-7 日精化学  
工業株式会社内